

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-149512

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)6月8日

A 61 K 9/127

D 7624-4C

47/34

H 7624-4C

B 01 J 13/02

8317-4G B 01 J 13/02

Z

審査請求 未請求 請求項の数 17 (全12頁)

⑮ 発明の名称 リボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤

⑯ 特 願 平1-63507

⑰ 出 願 平1(1989)3月17日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)8月11日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-198915

㉑ 発 明 者 吉 岡 浩 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
 ㉒ 発 明 者 後 藤 博 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
 ㉓ 出 願 人 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
 ㉔ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外1名

明 細 書

1. 発明の名称 リボソーム表面への蛋白質
吸着抑制剤

2. 特許請求の範囲

- 1) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する化合物からなることを特徴とするリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 2) 疎水性部と親水性高分子鎖部とは共有結合してなる請求項1記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 3) 親水性高分子鎖部の重合度は5～1000モルである請求項1または2に記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 4) 親水性高分子鎖部はポリエチレングリコールからなる請求項1ないし3のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 5) 疎水性部と親水性高分子鎖部とはエーテル結合で結合している請求項1ないし4のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。

- 6) 長鎖脂肪酸アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキルまたはグリセリン脂肪酸エステルアルコール性残基に親水性高分子鎖部が結合してなる請求項5に記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 7) リン脂質の親水性基に親水性高分子鎖部が結合してなる請求項1ないし4のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 8) リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである請求項7記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 9) 前記結合はトリアジン環を介してなる請求項7記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 10) 前記結合はアミド結合を介してなる請求項7記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 11) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有することを特徴とするリボソーム凝集防止剤。
- 12) 請求項1ないし9のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤の疎水性部を、リボ

ソーム膜を構成する脂質層に固定してなり、かつ親水性高分子鎖部はリボソーム表面から外方向に伸びてなる蛋白質の吸着が抑制されたリボソーム。

13) リボソームの内部にはヘモグロビンを内包してなる請求項12記載のリボソーム。

14) リボソームの懸濁液に請求項1ないし9のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤を添加し、次いで該懸濁液からリボソームを採取することを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたリボソームの製法。

15) 請求項1ないし9項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤をリボソーム膜形成脂質と均一に混合し、附られた混合物を用いてリボソームを形成させることを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたリボソームの製法。

16) 親水性高分子鎖部の一端がリボソーム膜を構成する脂質に直接結合し、他端はリボソーム表面から外方向に伸びてなる蛋白質の吸着が抑制されたリボソーム。

17) リボソームの懸濁液にリボソーム膜を構成する

脂質と結合しうる状態に活性化された親水性高分子を添加し、親水性高分子の一端はリボソーム膜を構成する脂質と結合し、他端はリボソーム表面から外方向に伸びるように反応させることを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたリボソームの製法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤に関する。

本発明はさらにリボソーム凝集防止剤に関する。

本発明はさらに蛋白質吸着の抑制されたあるいはリボソームの凝集が防止されたリボソームおよびその製法に関する。

(従来の技術)

リボソームを水溶性あるいは脂溶性の薬物の担体として利用しようとする試みが広く行われている (Gregoriadis et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 446, 319(1985))。また、リボソームの内部相に動物の酸素運搬体であるヘモグロビンを含

有させ、リボソームを人工赤血球として利用する試みも行われている (特開昭62-178521)。しかしながら、これらの試みにおいて使用されているリボソームのリボソーム膜構成材料はリン脂質やコレステロールなどの天然あるいは合成の脂質からのみなるものであった。

(発明が解決しようとする課題)

リボソームを薬物等の運搬体として利用する場合、リボソームを生体の血管内へ投与する必要がある。しかし、従来一般に使用されている脂質のみから成るリボソームは、生体の血漿成分の蛋白質 (例えばアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン等) を吸着し、吸着された蛋白質を介してリボソーム同士が凝集するという問題があった。特にリボソームの粒径が $0.1\mu\text{m}$ を越える場合に、この問題は顕著であった。通常一般に利用されるリボソームの粒径は $0.1\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}$ であって、そのまゝの状態であれば、毛細血管でも内径が数 μm があるので生体の血管内を通過するのに障害とはならない。しかしながら、リボソームが血漿成分の

蛋白質を吸着することにより凝集してしまうと、その凝集物の大きさは数十 μm にも達する。もし、血管内で凝集が生じればリボソームの凝集物が血管を栓塞し、血流を阻害して生体を死に至らしめる危険性がある。

特にリボソームを人工赤血球として利用する場合、大量のリボソームを投与しなければならず、血漿中でのリボソームの凝集は無視できない問題であった。しかし、血漿中でのリボソームの凝集を防止する技術は従来全くなかった。

また、リボソームを生体内に投与した場合、リボソームを抗原とした抗体としての蛋白質 (イムノグロブリン) がリボソームに吸着し、貪食細胞 (マクロファージ) に異物認識を与え、リボソームがマクロファージに取り込まれ、リボソームが短時間のうちに消失してしまう。そこでリボソームへの蛋白質吸着を抑制することにより、血漿中のリボソームの消失時間を遅延させることができる。

また、天然の赤血球中のヘモグロビン濃度は

約30%であり、全血液中の赤血球の体積割合(ヘマトクリット)が約50%であるので、全血液中のヘモグロビン濃度は約15%である。従って、天然の赤血球に比べて、粒径の小さなリボソームにヘモグロビンを内包させる人工赤血球では、ヘモグロビン濃度30%以上のヘモグロビン水溶液をリボソーム化しなければ、人工赤血球懸濁液中のヘモグロビン濃度を15%としたとき人工赤血球懸濁液中の人工赤血球の体積割合が50%を越えてしまい、流動性の乏しい懸濁液となり、これを循環血流中に投与すれば循環動態に悪影響を及ぼす。即ち、できるかぎり少量の脂質で大量のヘモグロビンをリボソームの内水相にカプセル化すること、言い換えれば、高いカプセル化効率の人工赤血球製造方法が望ましい。しかし、透析法や逆相法ではヘモグロビン濃度30%以上の高濃度、高粘度のヘモグロビン水溶液をリボソーム化することは困難である。また、薄膜法はリボソーム形成脂質を有機溶媒に均一溶解後、有機溶媒を除去した脂質薄膜に水性溶液を加えて分散させる方法であるが、有

機溶媒を除去した後のリボソーム形成脂質は固化、あるいはほとんど流動性を失った状態となるため、この状態で水性溶液を加えても容易に水和分散させることができない。水性溶液が高濃度のヘモグロビン水溶液である場合、グロビンタンパクへの結合水の割合が高く、脂質を水和させるための自由水の量が少ないので、さらに、効率の良いリボソーム化が困難であった。従って本発明の目的は、リボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤およびリボソーム凝集防止剤、血漿中での蛋白質吸着が抑制されたリボソームおよびその製法を提供することにある。さらに本発明の目的は、高濃度のヘモグロビンを効率良くリボソーム化する人工赤血球の製造方法を提供することにある。

【問題点を解決するための手段】

上記目的を達成するため、本発明者が鋭意研究を重ねた結果、リボソームの脂質層に特定の蛋白質吸着抑制剤を含有させることにより血漿中で蛋白質がリボソーム表面に吸着するのを防止することができ、ひいてはリボソーム同士の凝集を防止

し、さらに高濃度のヘモグロビン水溶液を用いて人工赤血球を製造する場合でも、脂質の水和が容易となり、効率良く高濃度のヘモグロビンをリボソーム化できることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば下記のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤、リボソーム凝集防止剤、これらを含有するリボソームおよびその製法が提供される。

- 1) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する化合物からなることを特徴とするリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 2) 疎水性部と親水性高分子鎖部とは共有結合してなる1項記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 3) 親水性高分子鎖部の重合度は5~1000モルである1項または2項に記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 4) 親水性高分子鎖部はポリエチレングリコールからなる1項ないし3項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 5) 疎水性部と親水性高分子鎖部とはエーテル結

合で結合している1項ないし4項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。

- 6) 長鎖脂肪酸アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキルまたはグリセリン脂肪酸エステルアルコール性残基に親水性高分子鎖部が結合してなる5項に記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 7) リン脂質の親水性基に親水性高分子鎖部が結合してなる1項ないし4項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 8) リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである7項記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 9) 前記結合はトリアジン環を介してなる7項記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 10) 前記結合はアミド結合を介してなる7項記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤。
- 11) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有することを特徴とするリボソーム凝集防止剤。

- 12) 1項ないし9項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤の疎水性部を、リボソーム膜を構成する脂質層に固定してなり、かつ親水性高分子鎖部はリボソーム表面から外方向に伸びてなる蛋白質の吸着が抑制されたリボソーム。
- 13) リボソームの内部にはヘモグロビンを内包してなる12項記載のリボソーム。
- 14) リボソームの懸濁液に1項ないし9項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤を添加し、次いで該懸濁液からリボソームを採取することを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたリボソームの製法。
- 15) 1項ないし9項のいずれかに記載のリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤をリボソーム膜形成脂質と均一に混合し、得られた混合物を用いてリボソームを形成させることを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたリボソームの製法。
- 16) 親水性高分子鎖部の一端がリボソーム膜を構成する脂質に直接結合し、他端はリボソーム表

面から外方向に伸びてなる蛋白質の吸着が抑制されたリボソーム。

- 17) リボソームの懸濁液にリボソーム膜を構成する脂質と結合しうる状態に活性化された親水性高分子を添加し、親水性高分子の一端はリボソーム膜を構成する脂質と結合し、他端はリボソーム表面から外方向に伸びるように反応させることを特徴とする蛋白質の吸着が抑制されたリボソームの製法。

本発明におけるリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤またはリボソーム凝集防止剤は、一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する化合物である。

疎水性部の好適な例としては長鎖脂肪酸アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルコールまたはグリセリン脂肪酸エステルアルコール性残基、およびリン脂質があげられる。親水性高分子鎖部の好適な例としては、ポリエチレングリコールがあげられる。

本発明においては特に、ポリエチレングリコー

ル(以下PEGという)と上記疎水性部アルコール性残基とがエーテル結合したPEG付加型非イオン界面活性剤、およびPEGとリン脂質とが共有結合したPEG結合リン脂質が好ましい。

本発明におけるポリエチレングリコール結合リン脂質とは、リン脂質の親水部(極性頭部)にポリエチレングリコール(PEG)を共有結合した構造の分子であり、一分子中に1または複数個のPEG鎖を含有する。PEG鎖のリン脂質と結合していない側の末端は、水酸基あるいはメチル、エチル等の短鎖のエーテル、酢酸、乳酸等の短鎖のエステルであっても良い。

本発明の目的のためには、PEG結合リン脂質分子中のPEG鎖長は、平均重合度で5~1000モルの範囲が望ましく、より好ましくは40~200モルである。この範囲を下回る場合には血漿中でのリボソーム凝集防止効果が発現され難く、この範囲を上回る場合にはPEG結合リン脂質の水溶性が高くなり、リボソーム膜中に固定され難くなる。

PEGとリン脂質を共有結合するには、リン脂

質の極性部に反応活性な官能基が必要である。これには、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基、ホスファチジルグリセロールの水酸基、ホスファチジルセリンのカルボキシル基等があり、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基が好ましく利用される。

リン脂質の反応活性な官能基とPEGを共有結合させるには、塩化シアマルを用いる方法、カルボジミドを用いる方法、酸無水物を用いる方法、グルタルアルデヒドを用いる方法、等がある。ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とPEGを結合するには、塩化シアマル(2,4,6-トリクロロ- β -トリアジン)を用いる方法が好ましく利用される。例えば、モノメトキシポリエチレングリコールと塩化シアマルを公知の反応操作で結合することにより、2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,8-ジクロロ- β -トリアジン(活性化PEG1)または2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ- β -トリアジン(活性化PEG2)が得ら

れる [Y. Inada, et al., Chem. Lett., 7, 773-778 (1980)]。これらとアミノ基を脱塩酸縮合反応により結合させることで、ホスファチジルエタノールアミンの極性頭部にPEGを共有結合させたリン脂質が得られる。ここで、活性化PEG1を用いた場合は一分子のリン脂質中に1本のPEG鎖を、活性化PEG2を用いた場合は2本のPEG鎖を含有することになる。また、モノメトキシPEGと無水コハク酸を反応させてPEG末端にカルボキシル基を導入し、これとホスファチジルエタノールアミンをカルボジイミド存在下で反応させることにより、アミド結合を介したPEG結合リン脂質が得られる。

本発明のPEG結合リン脂質を脂質層に含有するリポソームを製造するには、PEG結合リン脂質をリポソーム形成脂質と予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリポソームを形成させれば良い。ここで言うリポソーム形成脂質とは、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホス

ファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。リポソーム形成脂質とPEG結合リン脂質の混合比は、主成分であるリン脂質に対して、モル比で0.1モル%~50モル%、好ましくは0.5モル%~20モル%、より好ましくは1モル%~5モル%である。この範囲を下回る場合には、血漿中でのリポソーム凝集防止効果が不十分となり、この範囲を上回る場合には、PEG結合リン脂質の可溶化能により、リポソームが不安定となる。

PEG結合リン脂質と予め均一に混合するには、例えば、両者を揮発性の有機溶媒に溶解させた後、エバポレーションにより、有機溶媒を除去すれば良い。もし、脂溶性の薬物をリポソームに含有させるのであれば、このとき、リポソーム形成脂

質と共に混合しておけば良い。得られた混合脂質からリポソームを形成させるには、通常一般に行われているリポソーム化の方法に従って行うことが可能であり、例えば、振とう法、超音波照射法、フレンチプレス法等いずれの方法を用いても良い。上記のPEG結合リン脂質を上記の範囲で使用するかぎりにおいては、粒径0.1 μ m~1 μ mのリポソームが得られ、内水相に十分な水溶性の薬物や生理活性物質等を担持させることができる。得られたリポソームの脂質層中にはPEG結合リン脂質が含有されているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。PEG結合リン脂質の水溶性が高い場合にはリポソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。リポソーム脂質膜中におけるPEG結合リン脂質の存在状態は明らかではないが、PEG結合リン脂質の疎水性部がリポソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のPEG鎖が膜中の親水性領域から膜外の水性媒体中にかけて存在しているものと推定される。従って、本方

法によって得られたリポソームにおいては、PEG結合リン脂質のPEG鎖がリポソームの外水相側及び内水相側の両側に存在することになる。

本発明のPEG結合リン脂質は、必ずしも水に透明に溶解する必要はない。しかし、本発明のPEG結合リン脂質が水に対し、均一に溶解する場合は、さらに別の方法によっても本発明のリポソームを製造することができる。すなわち、通常一般に行われているリポソーム化の方法に従って製造された、すでに水溶性あるいは脂溶性の薬物を担持しているリポソームの懸濁液に、本発明のPEG結合リン脂質をそのままあるいは水溶液として添加することによっても、本発明のPEG結合リン脂質を脂質層に含有するリポソームを製造することができる。この場合、PEG結合リン脂質は水溶液中でミセル様の分子集合体を形成して分散していると思われるが、ここにリポソームが共存すれば、PEG結合リン脂質分子中の疎水性部が、リポソーム膜中の疎水性領域に疎水的相互作用によって固定され、親水性のPEG

鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

P E G 結合リン脂質を水溶液として添加する場合、その濃度は、臨界ミセル濃度以上であれば良いが、その濃度が低いと、リボソームへの吸着量が不十分となり血漿中でのリボソーム凝集防止効果が低下し、その濃度が高すぎるとリボソームを不安定にし、内水相に担持された水溶性薬物等の漏れ出しを引き起こしてしまう。従って、その濃度はリボソーム懸濁液中の濃度で0.01%~20%、より好ましくは、0.05%~2%である。

本発明のP E G 結合リン脂質を脂質層に含有するリボソームは、また別の方法によっても製造することができる。すなわち反応活性な官能基を持つリン脂質を含有するリボソームを常法にて製造した後、リボソーム外液に片末端活性化P E G を添加してリン脂質と結合させる。例えば、ホスファチジルエタノールアミンを全リン脂質中1モル%~50モル%含有するリボソームを製造し、塩基性(pH9以上)緩衝液中、活性化P E G 2を

1%~20%の濃度で添加し、室温で1時間~24時間反応させる。この場合、親水性のP E G 鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

本発明におけるポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤とは、親水性部としてポリオキシエチレン鎖を有し、親油性部(疎水性部)のアルコール性残基と、このポリオキシエチレン鎖とがエーテル結合により結ばれた分子構造を持つ非イオン界面活性剤である。例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、等である。

ポリオキシエチレン付加型非イオン界面活性剤でも、ポリオキシエチレン鎖と親油性部がエステ

ル結合により結ばれた分子構造を持つポリオキシエチレンエステル付加型非イオン界面活性剤をリボソームの脂質層に含有させた場合には、血漿中での蛋白質吸着抑制およびリボソーム凝集防止効果は低い。

本発明の目的のためにはポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子中のポリオキシエチレン鎖長は、エチレンオキサイド平均重合度で5~1000モルの範囲が望ましく、より好ましくは10~40モルである。この範囲を下回る場合には血漿中でのリボソーム凝集防止効果が発現され難く、この範囲を上回る場合には非イオン界面活性剤の水溶性が高くなり、リボソーム液中に固定され難くなる。

種々のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の中でも、特にポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルをリボソームの脂

質層に含有させた場合に、リボソームの血漿中での蛋白質吸着抑制および凝集防止効果が高い。

ポリオキシエチレンアルキルエーテルは、ポリオキシエチレンと飽和または不飽和の高級脂肪酸アルコールがエーテル結合により結ばれた構造を持つ。脂肪酸アルコールの炭素数は8~22の範囲が好適に用いられる。

ポリオキシエチレンステロールエーテルとは、ポリオキシエチレンとステロールがエーテル結合により結ばれた分子構造を持つものを言う。ステロールにはコレステロール、コレスタノールなどの動物ステロール(ズーステロール)、シトステロール、スチグマステロールなどの植物ステロール(フィトステロール)、エルゴステロール、チモステロールなどの菌類ステロール(マイコステロール)などがあり、本発明のポリオキシエチレンステロールエーテル中のステロールの種類は特に限定する必要はないが、コレステロールと同様の側鎖構造を持つものが好適に用いられる。

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアル

キルエーテルとは、飽和または不飽和の高級脂肪酸アルコールにポリオキシプロピレンがエーテル結合により付加し、さらにそのポリオキシプロピレンの末端水酸基にポリオキシエチレンがエーテル結合により付加した分子構造を持つ。ポリオキシプロピレンの平均重合度は2~8が好ましく、脂肪酸アルコールの炭素数は8~22の範囲が好適に用いられる。

ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルとは、グリセリン脂肪酸エステル(モノグリセリドまたはジグリセリド)の遊離の水酸基にポリオキシエチレンがエーテル結合により付加した分子構造を持つ。脂肪酸は飽和、不飽和のいずれであっても良いが、その炭素数は8~22の範囲が好適に用いられる。

本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を脂質層に含有するリボソームを製造するには、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤をリボソーム形成脂質と予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて

(分子量約1500)を用いる場合、リン脂質1モルに対するポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子では0.02~0.8モル、より好ましくは0.04~0.2モルであり、重量比ではリン脂質1重量部に対し、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤0.04~1.8重量部、より好ましくは0.08~0.4重量部である。この範囲を下回る場合には、血漿中でのリボソーム凝集防止効果が不十分となり、この範囲を上回る場合には、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の可溶性能により、リボソームが不安定となる。

ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤をリボソーム形成脂質と予め均一に混合するには、例えば、両者を揮発性の有機溶媒に溶解させた後、エバポレーションにより、有機溶媒を除去すれば良い。もし、脂溶性の薬物等をリボソームに含有させるのであれば、このとき、リボソーム形成脂質と共に混合しておけば良い。得られた混合脂質からリボソームを形成させるには、

常法によりリボソームを形成させれば良い。ここで言うリボソーム形成脂質とは、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。リボソーム形成脂質とポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の混合比は、主成分であるリン脂質1モルに対して、エチレンオキサイド単位で0.5モル~20モル、より好ましくは1モル~5モルである。これは、例えば、リン脂質としてジバルミトイルホスファチジルコリン(分子量752)、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤としてエチレンオキサイドの平均重合度25のポリオキシエチレンフィトスタノールエーテル

通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って行うことが可能であり、例えば、振とう法、超音波照射法、フレンチプレス法等いずれの方法を用いても良い。上記のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を上記の範囲で使用するかぎりにおいては、粒径0.1 μ m~1 μ mのリボソームが得られ、内水相に十分な水溶性の薬物や生理活性物質等を担持させることができる。得られたリボソームの脂質層中にはポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤が含有されているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の水溶性が高い場合にはリボソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。リボソーム脂質膜中におけるポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の存在状態は明らかではないが、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子中の疎水性部がリボソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のホ

リオキシエチレン類が膜中の親水性領域から膜外の水性媒体中にかけて存在しているものと推定される。従って、本方法によって得られたリボソームにおいては、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン類がリボソームの外水相側及び内水相側の両側に存在することになる。

本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤は、必ずしも水に透明に溶解する必要はない。しかし、本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤が水に対し、均一に溶解する場合は、さらに別の方法によっても本発明のリボソームを製造することができる。すなわち、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って製造された、すでに水溶性あるいは脂溶性の薬物を担持しているリボソームの懸濁液に、本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤をそのまま、あるいは水溶液として添加することによっても、本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イ

オン界面活性剤を脂質膜中に含有するリボソームを製造することができる。この場合、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤は水溶液中でミセルを形成して分散しているが、ここにリボソームが共存すれば、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子中の疎水性部が、リボソーム膜中の疎水性領域に疎水的相互作用によって固定され、親水性のポリオキシエチレン部はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を水溶液として添加する場合、その濃度は、臨界ミセル濃度以上であれば良いが、その濃度が低いと、リボソームへの吸着量が不十分となり血漿中でのリボソーム凝集防止効果が低下し、その濃度が高すぎるとリボソームを不安定にし、内水相に担持された水溶性薬物等の漏れ出しを引き起こしてしまう。従って、その濃度はリボソーム懸濁液中の濃度で0.01%~5%、より好ましくは0.1%~2%である。

人工赤血球を製造する場合、非イオン界面活性剤とリボソーム形成脂質との混合割合は0.5~30重量%が好ましく、この範囲を下回る場合には効率の良いヘモグロビンのリボソーム化が達成され難く、この範囲を上回る場合には、非イオン界面活性剤の可溶性能により、生成する人工赤血球が不安定となる。

本発明で使用するリボソーム形成脂質は、ホスファチジルコリン(レシチン)、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。

特に、これらリン脂質が不飽和結合を有する場合、これが過酸化反応を受けることによって発生

する脂質過酸化物による毒性の問題、また内包ヘモグロビンが酸化変性を受け易いといった問題があるため、この不飽和基に水素添加したものが好適に用いられる。例えば、入手が容易な水素添加天然リン脂質として水素添加卵黄レシチン、水素添加大豆レシチンなどがある。これら水素添加天然リン脂質を主成分とする場合、その相転移温度は50℃程度と高温である。一般にリボソームは相転移温度以上で操作しなければ形成され難いが、ヘモグロビンのリボソーム化する場合、40℃以上で操作するとヘモグロビンが熱変性を受けてしまう。しかし、リボソーム形成脂質としてステロール類を含有させれば、脂質混合物全体として明確な相転移点が存在なくなり、操作温度が主成分リン脂質の相転移温度以下でも十分に人工赤血球を製造することができる。また、生成した人工赤血球同士が凝集することを防止するために通常、荷電物質を含有させるが、これには高級飽和脂肪酸が好ましく用いられる。これらリボソーム形成脂質の混合比率はリン脂質1重量部に対してステ

ロール類 0.2~1 重量部、高級飽和脂肪酸 0.05~0.2 重量部が適当である。

非イオン界面活性剤とリボソーム形成脂質を混合するには、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の非イオン界面活性剤とリボソーム形成脂質を均一に溶解しうる揮発性有機溶媒に、これらを均一溶解後、有機溶媒をエバポレーション、凍結乾燥、スプレードライ等の方法により除去すれば良い。

得られた混合脂質から人工赤血球を形成させるには、ヘモグロビン水溶液中に該混合脂質を水和分散せよばよい。水和分散の方法は単に両者を機械的に混合するだけでも良いが、さらに、フレンチプレス細胞破砕機等を用いての高圧吐出処理を行うことが望ましい。ヘモグロビン水溶液のヘモグロビン濃度は30~80%が好ましく、この範囲を下回る場合には、ヘモグロビンのカプセル化効率が低く、この範囲を上回る場合には、ヘモグロビン水溶液の粘度が著しく高くなり、非イオン界面活性剤を加えた場合でも、水和分散が困難に

なる。

特に、水素添加リン脂質、ステロール類、高級飽和脂肪酸を上記範囲で混合したリボソーム形成脂質と上記範囲のヘモグロビン水溶液を使用する本発明の人工赤血球の製造方法においては、ヘモグロビンカプセル化効率の著しく低い粒径 $0.01\mu\text{m}$ ~ $0.03\mu\text{m}$ の人工赤血球は殆ど生成せず、大部分が粒径 $0.1\mu\text{m}$ 以上のヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球となる。

得られた人工赤血球の脂質層中には非イオン界面活性剤が含まれているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。非イオン界面活性剤の水溶性が高い場合にはリボソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。

次に実施例および比較例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

水素添加卵黄レシチン 830mg、コレステロール 317 mg、ミリスチン酸 53mg、ポリオキシエチレン

フィトスタノールエーテル (エチレンオキシド平均重合度 25、日光ケミカルズ株式会社 B P S H 25) 150 mg をジクロロメタン 20ml に溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に 50% ヘモグロビン水溶液 20ml を加え、振とう混合後、 $250\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧力でフレンチプレス処理を 10 回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により 10 倍に希釈して遠心分離処理 ($17,000\text{r.p.m.}$ 30 分) し、沈殿リボソームを生理食塩水 140ml により、さらに遠心洗浄を 2 回繰り返した。洗浄後の沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で 5% となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は $0.2\mu\text{m}$ であった。このリボソーム懸濁液 0.1ml とクエン酸加ヒト血漿 0.5ml を混合し、光学顕微鏡 (400 倍) により観察したところ、 $1\mu\text{m}$ を越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 2

水素添加卵黄レシチン 830mg、コレステロール 317 mg、ミリスチン酸 53mg をジクロロメタン 20ml

に溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に 50% ヘモグロビン水溶液 20ml を加え、振とう混合後、 $500\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧力でフレンチプレス処理を 10 回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により 10 倍に希釈して遠心分離処理 ($17,000\text{r.p.m.}$ 30 分) し、沈殿リボソームを生理食塩水 140ml により、さらに遠心洗浄を 2 回繰り返した。洗浄後の沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で 5% となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は $0.2\mu\text{m}$ であった。このリボソーム懸濁液 0.1ml とクエン酸加ヒト血漿 0.5ml を混合し、光学顕微鏡 (400 倍) により観察したところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは $50\mu\text{m}$ を越えるものであった。

ヘモグロビン濃度で 5% に調整した上記のリボソーム懸濁液 1ml に、2% のポリオキシエチレンオレイルエーテル (エチレンオキシド平均重合度 20) を含む生理食塩水 9ml を加え、室温で 30 分間放置した後、生理食塩水により 10 倍に希釈して

遠心分離処理 (17,000 r.p.m. 30分) し、沈殿リボソームを生理食塩水 140ml により、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液 0.1ml とグエン酸加ヒト血漿 0.5ml を混合し、光学顕微鏡 (400倍) により観察したところ、1 μ m を越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 3

実施例1のポリオキシエチレンフィトスタノールのかわりに、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル (エチレンオキサイド平均重合度20、プロピレンオキサイド平均重合度8) 150 mg を用いる以外は、実施例1と全く同様の検討を行ったところ、実施例1と同様の結果を得た。

実施例 4

実施例1のポリオキシエチレンフィトスタノールのかわりに、ポリオキシエチレングリセリルジステアレート (エチレンオキサイド平均重合度30) 150 mg を用いる以外は、実施例1と全く同様の検討を行ったところ、実施例1と同様の結果を得た。

ルズ社製 B P S H 25) 0.142g をジクロロメタン 20ml に溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、250kg/cm² の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して、孔径0.45 μ m のフィルターで濾過した後、遠心分離処理 (17,000 r.p.m. 30分) し、沈殿リボソームを生理食塩水 140ml により、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。ヘモグロビンカプセル化効率の低い人工赤血球は比重が小さいため、このとき沈殿せず除去される。洗浄後の沈殿人工赤血球をヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られた人工赤血球の平均粒径は 0.2 μ m であった。この人工赤血球懸濁液中の全脂質濃度は33mg/ml、ヘモグロビン回収率は12%であった。

非イオン界面活性剤を加えずに、実施例と全く同様の操作を行ったところ、平均粒径 0.2 μ m の人工赤血球が得られ、ヘモグロビン濃度で5%とな

るようになり、実施例1と同様の結果を得た。

比較例 1

実施例1のポリオキシエチレンフィトスタノールエーテルのかわりに、エチレンオキサイド平均重合度25のポリオキシエチレンモノステアレート 150 mg を用いる以外は実施例1と全く同様の検討を行ったところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50 μ m を越えるものであった。尚、ポリオキシエチレンジステアレート (n=10 or 140) についても同様の結果であった。

比較例 2

実施例2のポリオキシエチレンオレイルエーテルにかえて、ポリオキシエチレンモノステアレートを用いたところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50 μ m を越えるものであった。

実施例 5

水素添加卵黄レシチン1.81g、コレステロール 0.913g、ミリスチン酸0.153g、非イオン界面活性剤であるポリオキシエチレンフィトスタノール (エチレンオキサイド平均重合度25、日光ケミカ

ル) を生理食塩水中に懸濁させた人工赤血球懸濁液中の全脂質濃度は39mg/ml、ヘモグロビン回収率は7%であった。

実施例 6

ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン 150mg、活性PEG 2 (PEG 平均分子量 5,000 \times 2、生化学工業製) 2.5g を脱水クロロホルム50mlに溶解、炭酸ナトリウム2gを加えて、室温 overnight 反応させた。ニンヒドリン呈色の消失により反応終了を確認後、反応液を濾過し、ヘキサンを加えて再沈精製、真空乾燥してPEG結合リン脂質を得た。

水素添加卵黄レシチン 630mg、コレステロール 317 mg、ミリスチン酸53mg、上記のPEG結合リン脂質 150mg をジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、250kg/cm² の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希

釈して遠心分離処理 (17,000r.p.m.30分) し、沈澱リボソームを生理食塩水 140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は $0.2\mu\text{m}$ であった。このリボソーム懸濁液 0.1mlとクエン酸加ヒト血漿 0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、 $1\mu\text{m}$ を超えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 7

水素添加卵黄レシチン 530mg、コレステロール 817 mg、ミリスチン酸58mgをジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去了。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、 $500\text{kg}/\text{cm}^2$ の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理 (17,000r.p.m.30分) し、沈澱リボソームを生理食塩水 140mlにより、

かった。

実施例 8

ホスファチジルエタノールアミンを30モル%含有する水素添加大豆レシチンを水素添加卵黄レシチンのかわりに用いる以外は実施例7と同様にして、ヘモグロビン含有リボソームを得た。0.1Mほう酸緩衝液 (pH10) 中ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリボソーム懸濁液1mlに、活性化PEG2を100mg添加し、室温終夜反応させた。生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理 (17,000r.p.m.30分) し、沈澱リボソームを生理食塩水 140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液 0.1mlとクエン酸加ヒト血漿 0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、 $1\mu\text{m}$ を超えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

実施例 9

モノメトキシPEG5000 (ユニオンカーバイド

さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は $0.2\mu\text{m}$ であった。このリボソーム懸濁液 0.1mlとクエン酸加ヒト血漿 0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは $50\mu\text{m}$ を超えるものであった。

ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリボソーム懸濁液1mlに、1%の実施例6で得られたPEG結合リン脂質を含む生理食塩水9mlを加え、室温で30分間放置した後、生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理 (17,000r.p.m.30分) し、沈澱リボソームを生理食塩水 140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液 0.1 mlとクエン酸加ヒト血漿 0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、 $1\mu\text{m}$ を超えるリボソーム凝集物はほとんど認められな

社製) 50gを1,2-ジクロロメタン 250mlに溶解、無水コハク酸5gとピリジン4mlを加えて、3日間沸点還流した。濾過、エバポレーション後、100 mlの蒸留水に溶解し、水相をエーテルで洗浄後クロロホルム 100mlに抽出した。エバポレーション後、酢酸エチルで再結晶して片末端カルボキシPEGを得た。これを725mgとジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン 100mg、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド30mgを30mlのクロロホルムに溶解、50℃で終夜反応させた。反応液をヘキサン 300mlに再沈してアミド結合を介するPEG結合リン脂質を得た。これを用いた実施例6および7と同様の実験で同様の結果を得た。

【発明の効果】

以上詳しく説明したように、本発明によればリボソームの脂質層に特定の蛋白質吸着抑制剤を含有させることによって、血漿中でのリボソームへの蛋白質の吸着を抑制し、リボソームの凝集を防止したリボソームを提供することができる。

蛋白質吸着抑制剤は疎水性部と親水性高分子鎖

部からなり、親水部がリボソームの表面に露出していることによって、血漿タンパクのリボソームへの吸着が抑制され、その結果、血漿中でのリボソームの凝集が防止される。従って、生体の血管内へリボソームを投与した場合でも、リボソームの凝集物が血管内で栓塞して血流を阻害する心配がなく、特に大量のリボソームを投与する必要がある人工赤血球として有用性が高い。

本発明のリボソームの製造方法は、リボソーム形成脂質と蛋白質吸着抑制剤を予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリボソームを形成させる方法及び常法により製造されたリボソームの懸濁液に蛋白質吸着抑制剤を添加する方法であるので、従来知られているリボソームの応用技術のいずれの例にも広く適用することができる。

さらに本発明のリボソーム蛋白質吸着抑制剤を使用することにより、リボソーム形成脂質の水和分散が促進され、高濃度のヘモグロビン水溶液を用いた場合でも、ヘモグロビンカプセル化効率の

高い人工赤血球を高い収率で得ることができる。

特に、水素系加リン脂質、ステロール類、高級飽和脂肪酸を混合したリボソーム形成脂質と高濃度のヘモグロビン水溶液を使用する本発明の人工赤血球の製造方法においては、ヘモグロビンカプセル化効率の著しく低い粒径 $0.01\mu\text{m}\sim 0.03\mu\text{m}$ の人工赤血球は殆ど生成せず、大部分が粒径 $0.1\mu\text{m}$ 以上のヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球となる。

本発明の製造方法で得られるヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球では、人工赤血球懸濁液中のヘモグロビン濃度を高くしても、全脂質濃度は低く抑えることができるので、循環血流中へ投与した時の循環動態に与える悪影響も少なく、また脂質に由来する毒性も低く抑えることができる。しかも、従来の脂質分散のための手法はそのまま適用できるので、工業的な人工赤血球の製造方法として広範に応用し得る極めて優れた方法である。

(12) **EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(21) Application number: 89402290.4

(51) Int. Cl.⁵: A 61 K 9/127

(22) Date of filing: 11.08.89

(30) Priority: 11.08.88 JP 198915/88
 17.03.89 JP 63507/89
 (43) Date of publication of application:
 14.02.90 Bulletin 90/07
 (84) Designated Contracting States:
 BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

(71) Applicant: Terumo Kabushiki Kaisha
 No. 44-1, Hatagaya 2-chome Shibuya-ku
 Tokyo 151 (JP)
 (72) Inventor: Yoshida, Hiroshi
 c/o Terumo Kabushiki Kaisha 2656-1, Ohbuchi
 Fuji-shi Shizuoka-ken (JP)
 Goto, Hiroshi
 c/o Terumo Kabushiki Kaisha 2656-1, Ohbuchi
 Fuji-shi Shizuoka-ken (JP)
 (74) Representative: Gillard, Marie-Louise et al
 Cabinet Beau de Loménie 55, Rue d'Amsterdam
 F-75008 Paris (FR)

(54) Agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface.

(57) Agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface and liposomes which are agglutination-free by binding said inhibiting agent on the surface are disclosed. The above-mentioned inhibiting agents comprise a hydrophobic moiety and a hydrophilic macromolecular chain moiety. Adsorption of plasma proteins on the liposomes is inhibited due to the hydrophilic moiety exposed on the liposome surface with a result that agglutination of the liposomes in plasma is prevented. Therefore, there is no danger of embolism in blood vessels inhibiting blood flow when the liposomes are introduced into the living body. Accordingly, the liposomes are especially highly useful as artificial erythrocytes for which a large dose of liposomes is needed for administration.

Moreover, when liposomes are introduced into the living body, antibody protein (immunoglobulin) to the liposome which is an antigen will be adsorbed on the liposome to produce foreign body recognition in the phagocytes (macrophage) with a result that the liposome will be included in the macrophage and disappear within a short period of time. Thus, inhibition of the protein adsorption on liposome can delay disappearance of the liposome in plasma.

In addition, a method for preparing the above-described liposomes is disclosed.

EP 0 354 855 A2

Description

Agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface

Background of the Invention

Technical Field

The present invention relates to agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface.

Further, the invention relates to agents for preventing liposome agglutination.

Furthermore, the invention is concerned with liposomes on which adsorption of proteins is inhibited and which are agglutination-free and a method for preparing the same.

Prior Art

Use of liposomes as a carrier for water-soluble or fat-soluble drugs has widely been attempted (Gregoriadis, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 446, 319 (1985)). Use of liposomes as artificial erythrocytes by incorporating hemoglobin, the oxygen carrier for animals, in the inner aqueous space of liposomes has also been attempted (Japanese Patent Application Laid-Open to Public 178521/1987). Liposome membrane-constituting materials of the liposomes used in these attempts, however, were those composed only of natural or synthetic lipids such as phospholipids and cholesterol.

In order to use liposomes as a carrier for drugs it is necessary to introduce the liposomes into blood vessels in the living body. However, the liposomes composed only of lipids which were conventionally employed were encountered with problems of adsorbing plasma-constituting proteins of the living body (for example, albumin, globulin and fibrinogen) which results in mutual agglutination of the liposomes. The problems were considerable especially of the liposomes which particle size exceeds 0.1 μm . Particle size of the liposomes generally employed is usually 0.1 μm - 1 μm . The particle size as it is will be of no obstacle in passing through the blood vessels in the living body because the capillary blood vessels have inner diameter as large as several μm . However, if the liposomes are agglutinated by adsorbing plasma-constituting proteins, size of the agglutinates becomes tens of micrometers. If the agglutination occurs in the blood vessel, agglutinates of the liposomes will plug the blood vessel to inhibit blood flow possibly causing death of the living body.

Particularly when liposomes are used as artificial erythrocytes, a large dose of liposomes should be administered so that the problem of liposome agglutination in plasma was not negligible. Heretofore, however, there has been developed no technique at all for preventing the agglutination of liposomes in plasma.

In addition, when liposomes are introduced into the living body, antibody protein (immunoglobulin) to the liposome which is an antigen will be adsorbed on the liposomes to produce foreign body recognition in the phagocytes (macrophage) with a result that

the liposomes will be included in the macrophage and disappear within a short period of time. Therefore, inhibition of the protein adsorption on liposomes could also delay disappearance of the liposomes in plasma.

It is also noted that hemoglobin concentration in natural erythrocytes is approximately 30%; as volume ratio of erythrocytes to the whole blood (hematocrit) is approximately 50%, hemoglobin concentration in the whole blood is approximately 15%. Accordingly, in the case of artificial erythrocytes which are formed by enclosing hemoglobin in the liposome smaller in particle size than natural erythrocytes, volume ratio of artificial erythrocytes in an artificial erythrocyte suspension will exceed 50% when hemoglobin concentration in the artificial erythrocyte suspension is 15%, unless an aqueous solution of hemoglobin with a hemoglobin concentration of 30% or more is subjected to liposome formation. Such suspension, which is poorly fluidized, will produce adverse effects upon circulatory dynamism when administered. In this respect, it is desirable to encapsulate a large amount of hemoglobin in the inner aqueous space of liposomes using lipid in an amount as small as possible. In other words, a method for preparing artificial erythrocytes with a high encapsulation efficiency is desirable. By the dialysis method or the reverse phase method, however, it is difficult to form liposomes of an aqueous solution of hemoglobin with a higher hemoglobin concentration (30% or more) and a higher viscosity. Also by the lamina method in which a liposome-forming lipid is uniformly dissolved in an organic solvent, then the organic solvent is removed and an aqueous solution is added to the lamina of the lipid thus formed to a dispersion, the hydration and dispersion cannot easily be accomplished by the addition of an aqueous solution because the liposome-forming lipid after removal of the organic solvent has been solidified or nearly in loss of fluidity. When the aqueous solution is an aqueous solution of hemoglobin with a high concentration, proportion of the water combined with the globin protein is high, and amount of the free water available for hydration of the lipid is small. Thus, liposome formation at a high efficiency was difficult. Therefore, an object of the invention is to provide agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface, agents for preventing liposome agglutination, liposomes on which adsorption of proteins in plasma is inhibited and a method for preparing the same. A further object of the invention is to provide a method for preparing artificial erythrocytes comprising forming liposomes of a highly-concentrated hemoglobin at a high efficiency.

Summary of the Invention

As a result of extensive studies in order to achieve the above-mentioned objects we have found that adsorption of proteins in plasma on the surface of liposomes can be prevented by incorporating a

specific agent for inhibiting adsorption of proteins into lipid layer of the liposome, eventually preventing agglutination of the liposomes each other and further facilitating hydration of the lipid even when artificial erythrocytes are prepared with an aqueous solution of hemoglobin at a high concentration thereby enabling formation of liposomes of a highly-concentrated hemoglobin at a high efficiency. The present invention was completed on the basis of the above findings.

According to the invention, there are provided agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface, agents for preventing agglutination of liposomes, liposomes containing these agents and a method for preparing the same as described below.

1) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface comprising a compound having a hydrophobic moiety at one end and a hydrophilic macromolecular chain moiety at the other end.

2) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 1 wherein the hydrophobic moiety and the hydrophilic macromolecular chain moiety are covalently bound.

3) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 1 wherein degree of polymerization for the hydrophilic macromolecular chain moiety is 5 - 1000 moles.

4) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 1 wherein the hydrophilic macromolecular chain moiety consists of polyethylene glycol.

5) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 1 wherein the hydrophobic moiety and the hydrophilic macromolecular chain moiety are bound via an ether bond.

6) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 5 wherein the hydrophilic macromolecular chain moiety is bound with an alcoholic radical of a long chain-aliphatic alcohol, a sterol, a polyoxypropylene alkyl or a glycerin fatty acid ester.

7) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to items 1 - 4 wherein the hydrophilic macromolecular chain moiety is bound with the hydrophilic group of a phospholipid.

8) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 7 wherein the phospholipid is phosphatidylethanolamine.

9) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 7 wherein the bond is formed via a triazine ring.

10) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to item 7 wherein the bond is formed via an amide bond.

11) A liposome in which the hydrophobic

moiety of the agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to items 1 - 10 is fixed to the liposome membrane-constituting lipid layer and the hydrophilic macromolecular chain moiety externally extends from the liposome surface.

12) A liposome according to item 11 wherein hemoglobin is enclosed within the liposome.

13) A method for preparing liposomes on which adsorption of proteins is inhibited which comprises adding an agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to items 1 - 10 to a liposome suspension and then collecting the liposomes from said suspension.

14) A method for preparing liposomes on which adsorption of proteins is inhibited which comprises uniformly mixing an agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface with a liposome membrane-forming lipid and forming liposomes using the mixture thus obtained.

15) A liposome on which adsorption of proteins is inhibited comprising one end of a hydrophilic macromolecular chain moiety directly bound with a liposome membrane-constituting lipid and the other end externally extending from the liposome surface.

16) A method for preparing liposomes on which adsorption of proteins is inhibited which comprises adding a hydrophilic macromolecular compound activated so as to bind with a liposome membrane-constituting lipid to a liposome suspension and allowing to react in such a way that one end of the hydrophilic macromolecule is bound with the liposome membrane-constituting lipid and the other end is extended externally from the liposome surface.

Detailed Description of the Invention

The agents for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface or the agents for preventing agglutination of liposomes in the present invention are compounds which have a hydrophobic moiety at one end and a hydrophilic macromolecular chain moiety at the other end.

As preferred examples of the hydrophobic moiety are mentioned alcoholic radicals of a long chain aliphatic alcohol, a sterol, a polyoxypropylene alkyl or a glycerin fatty acid ester and phospholipids. As preferred examples of the hydrophilic macromolecular chain moiety are mentioned polyethylene glycols.

Especially preferable in the invention are non-ionic surface-active agents of PEG addition type in which a polyethylene glycol (called PEG hereinafter) and an alcoholic radical of the hydrophobic moiety are bound by ether bond or PEG-bound phospholipids in which PEG and a phospholipid are covalently bound.

The polyethylene glycol-bound phospholipid in the invention is a molecule of such a structure that polyethylene glycol (PEG) is covalently bound with the hydrophilic moiety (polar head) of a phospholipid which contains one or more PEG chains per

molecule. The end of the PEG chain that has not been bound with the phospholipid may also be hydroxyl group or an ether with a short chain such as with methyl or ethyl or an ester with a short chain such as with acetic acid or lactic acid.

In order to achieve the objects of the invention, PEG chain length in the PEG-bound phospholipid molecule is desirably in the range of 5 - 1000 moles, more preferably 40 - 200 moles in terms of the average degree of polymerization. Below the above-defined range, the effect of preventing agglutination of liposomes in plasma will hardly be produced. Beyond the above-defined range, water-solubility of the PEG-bound phospholipid will be too high to be readily fixed inside the liposome membrane.

In order to produce a covalent bond between PEG and a phospholipid a reaction-active functional group is necessary at the polar moiety of the phospholipid. The functional group includes amino group of phosphatidylethanolamine, hydroxyl group of phosphatidylglycerol, carboxyl group of phosphatidylserine and the like; the amino group of phosphatidylethanolamine is preferably used.

For the formation of a covalent bond between the reaction-active functional group of a phospholipid and PEG are mentioned a method employing cyanuric chloride, a method employing a carbodiimide, a method employing an acid anhydride, a method employing glutaraldehyde and the like. The method employing cyanuric chloride (2,4,6-trichloro-s-triazine) is preferably used for binding the amino group of phosphatidylethanolamine with PEG. For example, treatment of monomethoxypolyethylene glycol and cyanuric chloride by known reaction procedures affords 2-O-methoxypolyethylene glycol-4,6-dichloro-s-triazine (activated PEG1) or 2,4-bis-(O-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine (activated PEG2) [Y. Inada, et al., Chem. Lett., 7, 773-776 (1980)]. Binding of these with the amino group by a dehydrochloric acid condensation reaction yields a phospholipid with PEG covalently bound with the polar head of phosphatidylethanolamine. In the above reaction there is contained one PEG chain in one phospholipid molecule when employing activated PEG1 and two PEG chains with activated PEG2. Phospholipids bound with PEG via amide bond is also produced by reacting monomethoxy PEG with succinic anhydride to introduce a carboxyl group into the end of the PEG and reacting the product with phosphatidylethanolamine in the presence of a carbodiimide.

In order to prepare a liposome with the PEG-bound phospholipid of the invention contained in the lipid layer, a PEG-bound phospholipid may uniformly be mixed with a liposome-forming lipid in advance, and the lipid mixture may be treated by a conventional method to form liposomes. The liposome-forming lipids as herein referred to contain as the main component phospholipids obtained from natural materials such as egg yolk and soybean or those which are produced by organic chemical synthesis used alone or in combination. Representative are phosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. In addition, sterols such as cholesterol and cholestanol as a

membrane-stabilizing agent, phosphatidic acid, dicetyl phosphate and higher fatty acids as a charged substance and other additives may be added. Mixing ratio of the PEG-bound phospholipid with the liposome-forming lipid is 0.1 - 50 mol%, preferably 0.5 - 20 mol% and more preferably 1 - 5 mol% in terms of the molar ratio to the phospholipid of the main component. Below the above-defined range, the effect of preventing agglutination of liposomes in plasma will not be sufficiently high. Beyond the above-defined range, solubilizing capacity of the PEG-bound phospholipid will cause instabilization of the liposome.

In effecting in advance uniform mixing of the liposome-forming lipid with the PEG-bound phospholipid, for example, the two may be dissolved in a volatile organic solvent and then the organic solvent removed by evaporation. If a fat-soluble drug is to be contained in the liposomes, it may be mixed with the liposome-forming lipid during the above procedures. Formation of liposomes from the mixed lipids thus obtained may be carried out according to a liposome formation method usually employed. For example, any of such methods as shaking, sonication and French pressure cell may be employed. Liposomes of particle sizes between 0.1 μ m and 1 μ m are produced allowing for carrying a sufficient amount of a water-soluble drug or physiologically active substance in the inner aqueous space, provided that the above-mentioned PEG-bound phospholipid is used within the above-defined ranges. The PEG-bound phospholipid is contained in the lipid layer of liposomes thus obtained, but the content is not necessarily the same as that based upon the proportion originally mixed with the lipid. If water solubility of the PEG-bound phospholipid is high, part of it will possibly be eluted into the aqueous phase outside the membrane. Although the form of the PEG-bound phospholipid present in the lipid membrane of liposome is not clear, it is believed that the hydrophobic moiety of the PEG-bound phospholipid is present in the hydrophobic region of the liposome membrane, and the hydrophilic PEG chain is present from the hydrophilic region in the membrane over to the aqueous medium outside the membrane. It follows therefore that the PEG chain of the PEG-bound phospholipid in the liposome obtained by the method of the invention is present in both of the outer aqueous phase and the inner aqueous space of the liposome.

The PEG-bound phospholipid of the invention need not necessarily give a clear solution when dissolved in water. However, if the PEG-bound phospholipid of the invention is uniformly dissolved in water, the liposome of the invention may also be prepared by an alternative method. As a matter of fact, liposomes containing the PEG-bound phospholipid in the lipid layer may also be prepared as follows: To a suspension of liposomes carrying a water-soluble or fat-soluble drug or the like (which have been prepared by a conventionally employed liposome formation method) is added the PEG-bound phospholipid of the invention either as it is or in aqueous solution. In this case, the PEG-bound phospholipid appears to be in dispersion in the form

of micelle-like molecular aggregates in the aqueous solution. When liposomes are co-existent in the dispersion, the hydrophobic moiety in the PEG-bound phospholipid molecule is fixed in the hydrophobic region in the liposome membrane by hydrophobic interaction thereby taking a structure in which the hydrophilic PEG chain is exposed on the surface of liposomes on the side of the outer aqueous phase only.

Addition of the PEG-bound phospholipid in aqueous solution may be made at the critical micelle concentration or higher. At a lower concentration, however, amount of the phospholipid adsorbed on the liposome will not be sufficient to maintain the effect of preventing agglutination of liposomes in plasma. At a too high concentration, the liposome will be so unstable as eventually to cause leakage of the water-soluble drug or the like carried in the inner aqueous space. Therefore, the concentration is preferably 0.01 - 20%, more preferably 0.05 - 20% in terms of the concentration in the liposome suspension.

Liposomes containing the PEG-bound phospholipid in the lipid layer can also be prepared by an alternative method. As a matter of fact, liposomes containing a phospholipid with a reaction-active functional group are prepared by a conventional method, and subsequently a PEG activated at one end is added to the outer solution of the liposomes to allow for binding with the phospholipid. For example, liposomes containing 1 - 50 mol% of phosphatidylethanolamine in the whole phospholipid are prepared, activated PEG2 in a basic buffer solution (pH 9 or higher) is added at a concentration of 1 - 20% and the mixture is allowed to react at room temperature for 1 - 24 hours. There is formed a structure in which the hydrophilic PEG chain is exposed on the surface on the side of the outer aqueous phase of the liposomes.

The non-ionic surface-active agent of polyoxyethylene ether addition type as referred to in the invention is a non-ionic surface active agent having a molecular structure that contains a polyoxyethylene chain as the hydrophilic moiety and in which the polyoxyethylene chain is bound with an alcoholic radical of the lipophilic (hydrophobic) moiety by ether bond. It includes, for example, polyoxyethylene alkyl ethers, polyoxyethylene sterol ethers, polyoxyethylene alkylphenyl ethers, polyoxyethylene polyoxypropylene block polymers, polyoxyethylene polyoxypropylene alkyl ethers, polyoxyethylene glycerin fatty acid esters, polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters and the like.

Among non-ionic surface active agents of polyoxyethylene addition type, a non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ester addition type that has a molecular structure in which the polyoxyethylene chain is bound with the lipophilic moiety by ester bond is contained in the lipid layer of liposomes will produce a low effect in inhibiting adsorption of proteins in plasma and preventing agglutination of liposomes.

In order to achieve the objects of the invention the polyoxyethylene chain length in the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition

type is desirably in the range of 5 - 1000 moles, more preferably 10 - 40 moles in terms of the average degree of polymerization of ethylene oxide. Below the above-defined range, the effect of preventing agglutination of liposomes in plasma will hardly be developed. Beyond the above-defined range, water solubility of the non-ionic surface active agent will become too high to be readily fixed in the liposome membrane.

Among a variety of non-ionic surface active agents of polyoxyethylene ether addition type, polyoxyethylene alkyl ethers, polyoxyethylene sterol ethers, polyoxyethylene polyoxypropylene alkyl ethers and polyoxyethylene glycerin fatty acid esters are particularly effective in producing liposomes of high protein adsorption-inhibitory and agglutination-preventive effects when contained in the lipid layer of liposomes.

Polyoxyethylene alkyl ethers have a structure in which a polyoxyethylene and a saturated or unsaturated aliphatic alcohol are bound by ether bond. Aliphatic alcohols having 8 - 22 carbon atoms are preferably employed.

The polyoxyethylene sterol ethers are compounds having a molecular structure in which a polyoxyethylene and a sterol are bound by ether bond. The sterol includes animal sterols (zoosterols) such as cholesterol and cholestanol, plant sterols (phytosterols) such as sitosterol and stigmasterol and fungal sterols (mycosterols) such as ergosterol and zymosterol. Although it is not necessary to specify nature of the sterol in the polyoxyethylene sterol esters, those which have the same structure in the side chain as that of cholesterol are preferably used.

The polyoxyethylene polyoxypropylene alkyl ethers have a molecular structure in which a polyoxypropylene is added to a saturated or unsaturated aliphatic alcohol by ether bond, and to the end hydroxyl group of the polyoxypropylene is further added a polyoxyethylene by ether bond. Average degree of polymerization for the polyoxypropylene is preferably 2 - 8, and aliphatic alcohols having 8 - 22 carbon atoms are preferably employed.

The polyoxyethylene glycerin fatty acid esters have a molecular structure in which a polyoxyethylene is added to the free hydroxyl group of a glycerin fatty acid ester (monoglyceride or diglyceride). Either saturated or unsaturated fatty acids having 8 - 22 carbon atoms are preferably employed.

In order to prepare a liposome containing the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type in the lipid layer according to the invention, a non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type may uniformly be mixed with a liposome-forming lipid in advance, and the lipid mixture may be treated by a conventional method to form liposomes. The liposome-forming lipid as herein referred to contains as the main component phospholipids obtained from natural materials such as egg yolk and soybean or those which are produced by organic chemical synthesis used alone or in combination. Representative are phosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. In addition, sterols such as cholesterol or cholestanol as a

membrane-stabilizing agent, phosphatidic acid, decetyl phosphate and higher fatty acids as a charge-providing substance and other additives may be added. Mixing ratio of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type with the liposome-forming lipid is 0.5 - 20 moles, preferably 1 - 5 moles of ethylene oxide unit per mole of the phospholipid of the main component. For example, when dipalmitoylphosphatidylcholine (molecular weight 752) as the phospholipid and polyoxyethylene phytostanol ether with an average degree of polymerization of 25 for ethylene oxide (molecular weight ca. 1500) as the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type are used, molar ratio of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type is 0.02 - 0.8 moles, preferably 0.04 - 0.2 moles per mole of the phospholipid, and weight ratio is 0.04 - 1.6 parts by weight, preferably 0.08 - 0.4 parts by weight of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type per part by weight of the phospholipid. Below the above-defined range, the effect of preventing agglutination of liposomes will not be sufficient. Beyond the above-defined range, the liposomes will be unstable due to solubilizing capacity of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type.

In order to effect in advance uniform mixing of a surface active agent of polyoxyethylene ether addition type with a liposome-forming lipid, for example, the two may be dissolved in a volatile organic solvent, and then the organic solvent removed by evaporation. If a fat-soluble drug is to be contained in the liposome, it may be mixed with the liposome-forming lipid during the above procedures. Formation of liposomes from the mixed lipids thus obtained may be carried out according to a conventional liposome formation method. For example, any of such methods as shaking, sonication and French pressure cell may be employed. Liposomes with particle sizes of 0.1 - 1 μ m can be produced allowing for carrying a sufficient amount of a water-soluble drug or physiologically active substance in the inner aqueous space, provided that the above-mentioned non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type is used within the above-defined range. The non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type is contained in the lipid layer of liposomes thus obtained, but the content is not necessarily the same as that based upon the proportion originally mixed with the lipid. If water solubility of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type is high, part of it will possibly be eluted into the aqueous phase outside the membrane. Although the form of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type present in the lipid membrane of liposomes is not clear, it is believed that the hydrophobic moiety of the molecule of non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type is present in the hydrophilic region of the liposome membrane and the hydrophilic polyoxyethylene chain is present from the hydrophilic region in the membrane over to the aqueous medium outside the membrane. It

follows therefore that the polyoxyethylene chain of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type obtained by the method of the invention is present in both of the outer aqueous phase and the inner aqueous space of the liposome.

The non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type of the invention need not necessarily give a clear solution when dissolved in water. However, if the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type of the invention is uniformly dissolved in water, the liposome of the invention may also be prepared by an alternative method. As a matter of fact, liposomes containing the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type of the invention in the lipid layer may also be prepared as follows: To a suspension of liposomes carrying a water-soluble or fat-soluble drug or the like (which have been prepared by a liposome formation method generally employed) is added the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type of the invention either as it is or in aqueous solution. In this case, the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type is dispersed in the form of micelles in the aqueous solution. When liposomes are co-existent in the dispersion, the hydrophobic moiety in the non-ionic surface active agent molecule of polyoxyethylene ether addition type is fixed in the hydrophobic region in the liposome membrane by hydrophobic interaction thereby taking a structure in which the hydrophilic polyoxyethylene chain is exposed on the surface of liposomes on the side of the outer aqueous phase only.

Addition of the non-ionic surface active agent of polyoxyethylene ether addition type in an aqueous solution may be made at the critical micelle concentration or higher. At a lower concentration, however, the amount adsorbed on the liposome will not be sufficient to maintain the effect of preventing agglutination of liposomes in plasma. At a too high concentration, the liposome will be so unstable as eventually to cause leakage of the water-soluble drug or the like carried in the inner aqueous space. Therefore, the concentration is preferably 0.01 - 5%, more preferably 0.1 - 2% in terms of the concentration in the liposome suspension.

When artificial erythrocytes are prepared, mixing ratio of the non-ionic surface active agent to the liposome-forming lipid is preferably 0.5 - 30% by weight. Below the above-defined range, formation of hemoglobin liposomes will hardly be achieved at a high efficiency. Beyond the above-defined range, solubilizing capacity of the non-ionic surface active agent will destabilize the artificial erythrocytes formed.

The liposome-forming lipid used in the invention is phospholipids obtained from natural materials such as egg yolk and soybean or those which are produced by organic chemical synthesis. They are used as the main component either alone or in combination. Representative are phosphatidylcholine (lecithin), sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. In addition, sterols such as cholesterol and cholestanol as a

membrane-stabilizing agent, phosphatidic acid, dicetyl phosphate and higher fatty acids as a charge-providing substance and other additives may also be added.

If the phospholipid contains an unsaturated bond, there occur such special problems that lipid peroxides generated by peroxidation reaction of the unsaturated bond may be toxic, and the enclosed hemoglobin is liable to oxidative degradation. Therefore, hydrogenation products to the unsaturated group are preferably used. For example, hydrogenated egg yolk lecithin, hydrogenated soybean lecithin and the like are mentioned as hydrogenated natural phospholipid readily available. When such a hydrogenated natural phospholipid is employed as the main component, the phase transition temperature is as high as about 50°C. In general, liposomes are hardly formed unless the operation is carried out at the phase transition temperature or higher. However, hemoglobin will be heat degraded if formation of hemoglobin liposomes is operated at 40°C or higher. If sterols are contained in the liposome-forming lipid, there is no definite phase transition temperature for the whole lipid mixture, and artificial erythrocytes can be prepared satisfactorily even when operated at a temperature below the phase transition temperature of the lipid main component. Higher fatty acids are preferably employed as a charge-providing substance which is usually contained in order to prevent mutual agglutination of the formed artificial erythrocytes. Adequately, mixing ratios in these liposome-forming lipids are 0.2 - 1 part by weight of sterols and 0.05 - 0.2 parts by weight of higher fatty acids per part by weight of the phospholipid.

In order to prepare a mixture of a non-ionic surface active agent and a liposome-forming lipid the two may uniformly be dissolved in a volatile organic solvent capable of uniformly dissolving the non-ionic surface active agent and the liposome-forming lipid and then the organic solvent removed by such a method as evaporation, freeze-drying or spray-drying.

In order to form artificial erythrocytes from the mixed lipid obtained, said mixed lipid may be hydrated and dispersed in an aqueous solution of hemoglobin. Whereas the hydration and dispersion may be effected merely by mechanically mixing the two, it is desirable to add high pressure-delivery treatment using such a machine as a French pressure cell. Hemoglobin concentration in the aqueous solution of hemoglobin is preferably 30 - 60%. Below the above-defined range, encapsulation efficiency of the hemoglobin will be low. Beyond the above-defined range, viscosity of the aqueous solution of hemoglobin will be so much increased that the hydration and dispersion will be difficult even when a non-ionic surface active agent is added.

In the method for preparing artificial erythrocytes according to the invention in which a liposome-forming lipid with hydrogenated phospholipids, sterols or higher fatty acids mixed and an aqueous solution of hemoglobin in the above-defined range are used, there are produced almost none of the artificial

erythrocytes with particle sizes of 0.01 - 0.03 μm having very low hemoglobin encapsulation efficiency, but for the most part, artificial erythrocytes with particle sizes of 0.1 μm or larger having high hemoglobin encapsulation efficiency.

In the lipid layer of the artificial erythrocytes thus obtained is contained the non-ionic surface active agent content of which is not necessarily be the same as that based upon the initial mixing ratio with the lipid. In case where water solubility of the non-ionic surface active agent is high, part of it will possibly be eluted into the aqueous phase outside the membrane.

The invention will be described in more detail below with reference to Examples and Comparative Examples.

Example 1

In 20 ml of dichloromethane were dissolved 630 mg of hydrogenated egg yolk lecithin, 317 mg of cholesterol, 53 mg of myristic acid and 150 mg of polyoxyethylene phytostanol ether (average degree of polymerization for ethylene oxide 25, BPSH 25 manufactured by Nikko Chemicals K.K.). The organic solvent was removed by evaporation. To the mixed lipid thus obtained was added 20 ml of 50% aqueous solution of hemoglobin. The mixture was blended by shaking followed by French pressure cell under a pressure of 250 kg/cm². The treatment was repeated ten times, and the liquor obtained from the treatment through French pressure cell was 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. Average particle size of the liposomes thus obtained was 0.2 μm . With 0.1 ml of the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope (x 400) to find almost none of liposome agglutinates exceeding 1 μm in size.

Example 2

In 20 ml of dichloromethane were dissolved 630 mg of hydrogenated egg yolk lecithin, 317 mg of cholesterol and 53 mg of myristic acid. The organic solvent was removed by evaporation. To the mixed lipid thus obtained was added 20 ml of 50% aqueous solution of hemoglobin. The mixture was blended by shaking followed by French pressure cell under a pressure of 500 kg/cm². The treatment was repeated ten times, and the liquor obtained was 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. Average particle size of the liposomes thus obtained was 0.2 μm . With 0.1 ml of

the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope (x 400) to find that the liposomes were completely agglutinated to agglutinates exceeding 50 μm in size.

To 1 ml of the above-mentioned liposome suspension adjusted to a hemoglobin concentration of 5% was added 9 ml of physiological saline solution containing 2% polyoxyethylene oleyl ether (average degree of polymerization for ethylene oxide 20). The mixture was allowed to stand at room temperature for 30 min., 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing was suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. With 0.1 ml of the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope (x 400) to find almost none of the liposome agglutinates exceeding 1 μm in size.

Example 3

Investigations were made exactly in the same way as in Example 1 except that 150 mg of polyoxyethylene polyoxypropylene cetyl ether (average degree of polymerization for ethylene oxide 20 and for propylene oxide 8) was used in place of the polyoxyethylene phytostanol used in Example 1. There were produced the same results as in Example 1.

Example 4

Investigations were made exactly in the same way as in Example 1 except that 150 mg of polyoxyethylene glyceryl distearate (average degree of polymerization for ethylene oxide 30) was used in place of the polyoxyethylene phytostanol used in Example 1. There were produced the same results as in Example 1.

Comparative Example 1

Investigations were made exactly in the same way as in Example 1 except that 150 mg of polyoxyethylene monostearate with an average degree of polymerization for ethylene oxide of 25 was used in place of the polyoxyethylene phytostanol ether used in Example 1. The liposomes were completely agglutinated. The agglutinates exceed 50 μm in size.

In addition, the same results were also produced with polyoxyethylene distearate ($n=10$ or 140).

Comparative Example 2

When polyoxyethylene monostearate was used in place of the polyoxyethylene oleyl ether used in Example 2, the liposomes were completely agglutinated. The agglutinates exceed 50 μm in size.

Example 5

In 20 ml of dichloromethane were dissolved 1.81 g of hydrogenated egg yolk lecithin, 0.913 g of

cholesterol, 0.153 g of myristic acid and 0.142 g of polyoxyethylene phytostanol (average degree of polymerization for ethylene oxide 25, BPSH 25 manufactured by Nikko Chemicals K.K.) as a non-ionic surface active agent. The organic solvent was removed by evaporation. To the mixed lipid thus obtained was added 20 ml of 50% aqueous solution of hemoglobin. The mixture was blended by shaking followed by French pressure cell under a pressure of 250 kg/cm². The treatment was repeated ten times, and the liquor obtained was 1:10 diluted with physiological saline solution. The dilution was filtered through a filter with a pore size of 0.45 μm and then subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. As the artificial erythrocytes that will be low in efficiency of hemoglobin encapsulation are not precipitated due to their low specific gravity and removed during the above operations. The artificial erythrocyte precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. Average particle size of the artificial erythrocytes thus obtained was 0.2 μm . The entire lipid concentration in the artificial erythrocyte suspension was 33 mg/ml, and recovery ratio of the hemoglobin was 12%.

When exactly the same operations as above were conducted but without adding a non-ionic surface active agent, there were produced artificial erythrocytes with an average particle size of 0.2 μm . The entire lipid concentration in the artificial erythrocyte suspension adjusted to a hemoglobin concentration of 5% was 39 mg/ml, and recovery ratio of the hemoglobin was 7%.

Example 6

In 50 ml of dehydrated chloroform were dissolved 150 mg of dipalmitoylphosphatidylethanolamine and 2.5 g of activated PEG2 (average molecular weight of PEG 5,000 x 2, manufactured by Seikagaku Kogyo K.K.). To the solution was added 2 g of sodium carbonate, and the mixture was allowed to react overnight at room temperature. After confirming completion of the reaction by disappearance of the ninhydrin color reaction the reaction mixture was filtered, and hexane was added to the filtrate for purification by re-precipitation. The purified product was dried in vacuo to obtain a PEG-bound phospholipid.

In 20 ml of dichloromethane were dissolved 630 mg of hydrogenated egg yolk lecithin, 317 mg of cholesterol, 53 mg of myristic acid and 150 mg of the above-obtained PEG-bound phospholipid. The organic solvent was removed by evaporation. To the mixed lipid thus obtained was added 20 ml of 50% aqueous solution of hemoglobin. The mixture was blended by shaking followed by French pressure cell under a pressure of 250 kg/cm². The treatment was repeated ten times, and the liquor obtained was 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.).

The liposome precipitates were subjected to

additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. Average particle size of the liposomes thus obtained was 0.2 μm . With 0.1 ml of the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope to find almost none of liposome agglutinates exceeding 1 μm in size.

Example 7

In 20 ml of dichloromethane were dissolved 630 mg of hydrogenated egg yolk lecithin, 317 mg of cholesterol and 53 mg of myristic acid. The organic solvent was removed by evaporation. To the mixed lipid thus obtained was added 20 ml of 50% aqueous solution of hemoglobin. The mixture was blended by shaking followed by French pressure cell under a pressure of 500 kg/cm^2 . The treatment was repeated ten times, and the liquor obtained was 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. Average particle size of the liposomes thus obtained was 0.2 μm . With 0.1 ml of the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope (x 400) to find liposomes completely agglutinated. Size of the agglutinates exceeded 50 μm .

To 1 ml of the above-prepared liposome suspension adjusted to a hemoglobin concentration of 5% was added 9 ml of physiological saline solution containing 1% of the PEG-combined phospholipid obtained in Example 6. The mixture was allowed to stand at room temperature for 30 min., then 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. With 0.1 ml of the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope (x 400) to find almost none of the liposome agglutinates exceeding 1 μm in size.

Example 8

The same procedures as in Example 7 were repeated except that hydrogenated soybean lecithin containing 30 mol% of phosphatidylethanolamine was used in place of the hydrogenated egg yolk lecithin to obtain hemoglobin-containing liposomes. To 1 ml of a suspension of the above-prepared liposomes adjusted with 0.1 M borate buffer solution (pH 10) to a hemoglobin concentration of 5% was added 100 mg of activated PEG2. The mixture was

allowed to react overnight at room temperature. The reaction mixture was 1:10 diluted with physiological saline solution and subjected to centrifugal separation (17,000 r.p.m. for 30 min.). The liposome precipitates were subjected to additional centrifugal washing with two portions of 140 ml of physiological saline solution. The liposome precipitates after the washing were suspended in physiological saline solution to a hemoglobin concentration of 5%. With 0.1 ml of the liposome suspension was mixed 0.5 ml of citrate-containing human plasma. The mixture was observed under optical microscope (x 400) to find almost none of the liposome agglutinates exceeding 1 μm in size.

Example 9

To a solution of 50 g of monomethoxy PEG5000 (manufactured by Union Carbide) in 250 ml of 1,2-dichloromethane were added 5 g of succinic anhydride and 4 ml of pyridine. The mixture was boiled under reflux for 4 days. The reaction mixture was filtered, subjected to evaporation and dissolved in 100 ml of distilled water. The aqueous phase was washed with ether and then extracted with 100 ml of chloroform. After evaporated the residue was recrystallized from ethyl acetate to give monocarboxy-terminated PEG. In 30 ml of chloroform were dissolved 725 mg of the PEG, 100 mg of dipalmitoylphosphatidylethanolamine and 30 mg of dicyclohexylcarbodiimide. The solution was allowed to react overnight at 50°C. The reaction mixture was subjected to re-precipitation with 300 ml of hexane. There was obtained phospholipid bound via amide bond with PEG. The same results as in Examples 6 and 7 were produced in an experiment using the phospholipid.

Claims

1) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface comprising a compound having a hydrophobic moiety at one end and a hydrophilic macromolecular chain moiety at the other end.

2) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 1 wherein the hydrophobic moiety and the hydrophilic macromolecular chain moiety are covalently bound.

3) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 1 wherein degree of polymerization for the hydrophilic macromolecular chain moiety is 5 - 1000 moles.

4) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 1 wherein the hydrophilic macromolecular chain moiety consists of polyethylene glycol.

5) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 1 wherein the hydrophobic moiety and the hydrophilic macromolecular chain moiety are bound via an ether bond.

6) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to

Claim 5 wherein the hydrophilic macromolecular chain moiety is bound with an alcoholic radical of a long chain-aliphatic alcohol, a sterol, a polyoxypropylene alkyl or a glycerin fatty acid ester.

7) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claims 1-4 wherein the hydrophilic macromolecular chain moiety is bound with the hydrophilic group of a phospholipid.

8) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 7 wherein the phospholipid is phosphatidylethanolamine.

9) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 7 wherein the bond is formed via a triazine ring.

10) An agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claim 7 wherein the bond is formed via an amide bond.

11) A liposome in which the hydrophobic moiety of the agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claims 1-10 is fixed to the liposome membrane-constituting lipid layer and the hydrophilic macromolecular chain moiety externally extends from the liposome surface.

12) A liposome according to Claim 11 wherein hemoglobin is enclosed within the liposome.

13) A method for preparing liposomes on which adsorption of proteins is inhibited which comprises adding an agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface according to Claims 1-10 to a liposome suspension and then collecting the liposomes from said suspension.

14) A method for preparing liposomes on which adsorption of proteins is inhibited which comprises uniformly mixing an agent for inhibiting adsorption of proteins on the liposome surface with a liposome membrane-forming lipid and forming liposomes using the mixture thus obtained.

15) A liposome on which adsorption of proteins is inhibited comprising one end of a hydrophilic macromolecular chain moiety directly bound with a liposome membrane-constituting lipid and the other end externally extending from the liposome surface.

16) A method for preparing liposomes on which adsorption of proteins is inhibited which comprises adding a hydrophilic macromolecular compound activated so as to bind with a liposome membrane-constituting lipid to a liposome suspension and allowing to react in such a way that one end of the hydrophilic macromolecule is bound with the liposome membrane-constituting lipid and the other end is extended externally from the liposome surface.

35

40

45

50

55

60

65

10